

Summary

The tumor microenvironment (TME) plays a critical role in glioblastoma (GBM) progression and therapy resistance. The immune composition of the TME and the interactions among immune cells in genetically engineered glioma models remain poorly characterized. Using single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) with a panel of antibodies (CITE-seq) and Visium Spatial Transcriptomics, I performed a comprehensive analysis of the immune cell composition in GL261 gliomas, focusing on functional phenotypes of myeloid cells, T cells, and NK cells, in order to create the best to date description of TME in the most popular high-grade glioma (HGG) model. Building on prior work, I redefined macrophages into four functionally distinct states, demonstrating that higher cluster counts in earlier studies arise from over-clustering and reduce translational relevance, while expanding phenotypic characterization to include metabolic and spatial dynamics.

In the lymphoid compartment, I identified all major T cell populations and determined their distribution and ratios, consistent with the GL261 glioma moderate immunogenicity. NK cells exhibited a glioma-associated phenotype with reduced cytotoxicity and increased expression of tumor-promoting factors. Ligand-receptor analyses highlighted the immunosuppressive interactions between macrophages and lymphoid cells, further emphasizing the role of myeloid cells in T cell suppression.

To study the effects of the IDH1 R132H mutation on the immune TME, I employed CITE-seq and Spatial Transcriptomics in genetically defined mouse models. 2-hydroxyglutarate (2-HG), metabolite produced by cells with IDH1 mutation, suppressed T cell proliferation, metabolic activity, and oxidative phosphorylation while impairing myeloid antigen presentation and T cell recruitment. These findings underscore the complex interplay between glioma-associated factors and the immune microenvironment, offering new insights into tumor progression and potential therapeutic targets.

This study advances our understanding of glioma TME heterogeneity, particularly in GL261 and IDH1-mutant HGG models, providing a robust framework for translational research and therapeutic development.

Streszczenie

Mikrośrodowisko guza (tumor microenvironment, TME) odgrywa kluczową rolę w progresji glejaka wielopostaciowego (GBM) i oporności na terapię. Skład komórek odpornościowych w TME i interakcje między różnymi komórkami odpornościowymi w genetycznie zdefiniowanych modelach glejaka nie zostały określone. Wykorzystując sekwencjonowanie RNA na poziomie pojedynczych komórek (scRNA-seq) z panelem przeciwciał (CITE-seq) oraz transkryptomikę przestrzenną Visium (10X Genomics), przeprowadziłem kompleksową analizę komórek odpornościowych w mikrośrodowisku glejaka GL261, skupiając się na charakterystyce komórek mieloidalnych, limfocytów T oraz komórek NK, w celu stworzenia najbardziej dokładnego dotychczas opisu TME w najbardziej popularnym modelu glejaka o wysokiej złośliwości (high grade glioma, HGG). Bazując na wynikach wcześniejszych badań, udoskonaliłem klasyfikację funkcjonalnych podtypów makrofagów, wyróżniając cztery odrębne stany, jednocześnie rozszerzając charakterystykę fenotypową o dynamikę metaboliczną i przestrzenną. Wykazałem, że większa liczba podtypów proponowana w innych pracach wynika z nadmiernej klasteryzacji i ogranicza przydatność translacyjną.

W obrębie komórek limfoidalnych zidentyfikowałem główne populacje limfocytów T, określając ich rozkład i proporcje, co potwierdziło umiarkowaną immunogenność komórek glejaka GL261. Komórki NK wykazywały fenotyp związany z glejakiem, charakteryzujący się obniżoną cytotoksycznością i zwiększoną ekspresją czynników promujących rozwój guza. Analiza interakcji ligand-receptor uwydatniła immunosupresyjną rolę makrofagów w supresji limfocytów T.

Aby zbadać wpływ często występującej w HGG mutacji *IDH1* R132H na mikrośrodowisko, przeprowadziłem analizę danych CITE-seq z komórek CD45+ sortowanych z guzów i z transkryptomiki przestrzennej Visium w modelach złośliwych glejaków u myszy. 2-hydroksyglutaran (2-HG), metabolit produkowany przez komórki z mutacją *IDH1*, redukuje proliferację limfocytów T, aktywność metaboliczną i fosforylację oksydacyjną, jednocześnie upośledzając prezentację antygenów przez komórki mieloidalne oraz rekrutację limfocytów T. Uzyskane wyniki podkreślają złożone interakcje czynników

produkowanych przez komórki glejaka z komórkami odpornościowymi w mikrośrodowisku guza, dostarczając nowych informacji o mechanizmach progresji guza, deficytach obrony przeciwnowotworowej i potencjalnych celach terapeutycznych.

Wyniki prezentowanych badań poszerzają wiedzę na temat dynamiki odpowiedzi przeciwnowotworowej w TME w glejakiach GL261 i glejakiach ze zmutowanym IDH1, dostarczając solidnych podstaw do badań translacyjnych i rozwoju nowych terapii.